

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07101815 A**

(43) Date of publication of application: **18 . 04 . 95**

(51) Int. Cl.

A01N 63/02

(21) Application number: **03357499**

(22) Date of filing: **26 . 12 . 91**

(71) Applicant: **KUBOTA AKIMASA HOKKAIDO
GREEN KOSAN:KK**

(72) Inventor: **KUBOTA AKIMASA
SASAKI SUSUMU**

(54) **PLANT BLIGHT CONTROLLING AGENT, ITS
PRODUCTION AND USE**

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide an agent harmless to human and animal and capable of surely control plant blight without causing the destruction of environment and ecosystem in contrast to conventional agrochemicals.

CONSTITUTION: This plant blight controlling agent is composed of a cultured liquid or concentrated and dried powder of the cultured liquid obtained by culturing *Trichoderma harzianum* SK-5 (a microorganism antagonistic to plant blight pathogen) under a fermentation condition suitable for the production of the antagonistic substance. The invention also relates

to a plant blight controlling agent produced by adding the microbial cell and conidiospore of separately cultured *Trichoderma harzianum* SK-5, a process for the production of the plant blight controlling agent having high antagonistic property by transferring the plant blight antagonistic substance from the cultured liquid obtained by the above process to a hydrophobic organic solvent layer and removing the organic solvent and a method for using the plant blight controlling agent by adsorbing the highly antagonistic substance obtained by the above process to an adsorbent, separating from the adsorption liquid, drying the adsorbent and scattering on or embedding in the soil.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-101815

(43) 公開日 平成7年(1995)4月18日

(51) Int.Cl.⁹

A 0 1 N 63/02

識別記号

P

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数7 F D (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平3-357499

(22) 出願日 平成3年(1991)12月26日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年11月21日発行の北海タイムス新聞に掲載

(71) 出願人 392001793

久保田 昭正

大阪府河内長野市市町1415-9 7-203

(71) 出願人 392001461

株式会社北海道グリーン興産

北海道札幌市中央区北1条西18丁目1番地

(72) 発明者 久保田 昭正

大阪府河内長野市市町1415-9 7-203

(72) 発明者 佐々木 進

北海道札幌市中央区北1条西19丁目2番地

第2ファミリー大通り 313号

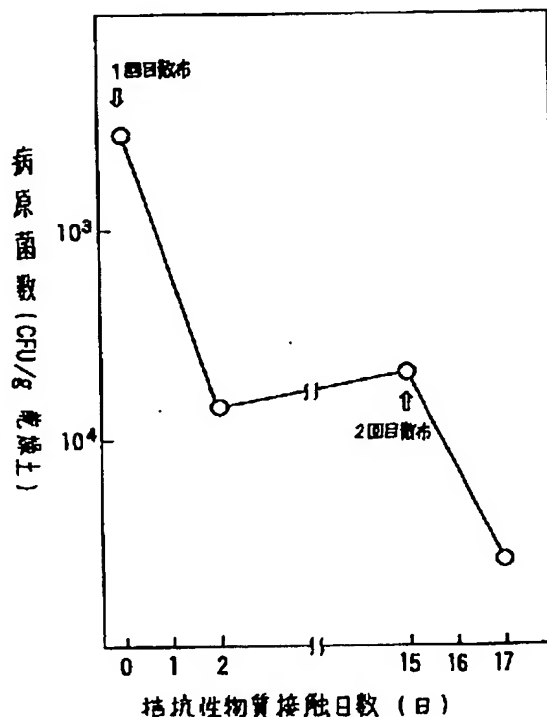
(74) 代理人 弁理士 鈴木 正次

(54) 【発明の名称】 植物病害防除剤およびその製造法並びに使用法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 この発明は、農薬のような環境破壊及び生態系の破壊のおそれなく、人畜無害で、植物の病害を確実に防除することを目的としたものである。

【構成】 植物病原菌に拮抗性を有する微生物をトルコデルマ ハルジアナムSK-5を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養し、これにより得た培養液又は培養液の濃縮乾燥粉末よりなる植物病害防除剤。植物病害防除剤に、別途培養したトリコデルマ ハルジアナムSK-5の菌体、分生子を含ませた植物病害防除剤。前記により得た培養液に含まれた植物病害拮抗性物質を、疎水性有機溶媒層に移した後、前記有機溶媒を取除き高拮抗性とした植物病害防除剤の製造法。前記により得た高拮抗性物質を吸着材に吸着させて吸着液から分離後、吸着材を乾燥した後、土壌に散布又は埋設する植物病害防除剤の使用法。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナム SK-5 を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養しこれより得た培養醗酵液よりなることを特徴とした植物病害防除剤

【請求項 2】 植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナム SK-5 を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養しこれにより得た培養液を濃縮し、又は濃縮後乾燥粉末としたことを特徴とする植物病害防除剤。

【請求項 3】 植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナム SK-5 を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養することにより得た培養液に含まれた植物病害拮抗性物質を疎水性有機溶媒層に移した後、前記有機溶媒を取除き、高拮抗性の植物病害防除剤とすることを特徴とした植物病害防除剤の製造法。

【請求項 4】 植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナム SK-5 を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養することにより得た培養液中の拮抗性物質を選択的に吸着材に吸着させた後、溶媒により溶出して、高拮抗性の植物病害防除剤とすることを特徴とした植物病害防除剤の製造法。

【請求項 5】 植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナム SK-5 を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養することにより得た培養液中に、吸着材を添加し、液中の植物病害拮抗性物質を選択的に吸着させて吸着液から分離後、吸着材を乾燥し、前記拮抗性物質を含む吸着材乾燥物とすることを特徴とした植物病害防除剤の製造法。

【請求項 6】 植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナム SK-5 を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養することにより得た培養液中に、吸着材を添加し、液中の植物病害拮抗性物質を選択的に吸着させて吸着液から分離後、吸着材を乾燥し、前記拮抗性物質を含む吸着材乾燥物とし、該吸着材乾燥物を土壌に撒布又は埋設することを特徴とした植物病害防除剤の使用法。

【請求項 7】 請求項 1 乃至 6 の何れか 1 つ記載の植物病害防除剤に、別途培養したトリコデルマ ハルジアナム SK-5 の菌体、分生子を含ませたことを特徴とする植物病害防除剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、トリコデルマ ハルジアナム SK-5 のように、植物病原菌に拮抗性物質を持つ微生物を用いて、植物病原菌を防除することを目的とした植物病原菌防除剤およびその製造法並びに使用法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来植物病原菌の防除に関しては専ら農

薬を使用していた。然し乍ら農薬散布については、自然環境保全の要求が強くなり、近來比較的毒性の低いと考えられる微生物の使用が注目されるに至ったが、この方法は微生物の菌体、孢子又は分生子を含む粉剤を主体とするものであった。

【0003】 従来トリコデルマ属菌の分生子又はその抽出物よりなる微生物防除剤が知られており、(特開平 1-102010 号) 茸類の生育阻止効果が報告されていた。また糸状菌トリコデルマ SP-35/84、殺菌剤が知られているが(特開平 2-245178 号)、植物種子の腐敗防止に有効であるとされていた。

【0004】

【発明により解決すべき課題】 然るに農薬は環境汚染による二次公害が発生し、生態系の破壊及び人体へ悪影響を生じるなどの問題点があり、かつ多量に継続的に使用しなければ効力を期待できない問題点があった。一方微生物は、土壌中の栄養状態、微生物相、温度、気温等の条件により、必ずしも土壌に定着して継続的に拮抗性物質を産生することが不安定であり、信頼性のある病害防除とはならなかった。

【0005】 また農薬に対して薬効が遅い問題点もあった。

【0006】 前記従来知られていたトリコデルマは、茸類の生育阻止とか、植物種子の腐敗防止について有効なことが知られていた。然し乍ら植物病原菌の防除(例えば芝草に対し)については未だ知られていなかった。

【0007】

【課題を解決する為の手段】 然るにこの発明は、植物病害菌の拮抗性物質を工業的に産生し、必要に応じて拮抗菌と共に土壌に施すことにより、前記従来の問題点を解決したのである。

【0008】 即ち防除剤の発明は、植物病原菌に拮抗性を有する微生物を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養し、これにより得た培養液よりなることを特徴とした植物病害防除剤である。また植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナム SK-5 としたものである。次に他の発明は植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナム SK-5 を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養し、これにより得た培養液を濃縮し、又は濃縮後乾燥粉末としたことを特徴とする植物病害防除剤である。

【0009】 前記防除剤の製造法の発明は、植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナム SK-5 を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養し、これにより得た培養液に含まれる植物病害拮抗性物質を疎水性有機溶媒層に移した後、前記有機溶媒を取除き、高拮抗性の植物病害防除剤とすることを特徴とした植物病害防除剤の製造法であり、植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナム SK-5 を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養し、これにより得た培養

液中の拮抗性物質を選択的に吸着材に吸着させた後、溶出溶媒により分離して、高拮抗性の植物病害防除剤とすることを特徴とした植物病害防除剤の製造法である。次に植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナムSK-5を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養し、これにより得た培養液中に、吸着材を添加し、液中の植物病原菌拮抗性物質を選択的に吸着材で吸着後、液から分離し、吸着材を乾燥し、前記拮抗性物質を含む吸着材の乾燥物とすることを特徴とした植物病害防除剤の製造法である。

【0010】前記防除剤の使用法の発明は、植物病原菌に拮抗性を有するトリコデルマ ハルジアナムSK-5を、拮抗性物質産生に適した培養醗酵条件で培養し、これにより得た培養液中に、吸着材を添加し、液中の植物病原菌拮抗性物質を選択的に吸着材で吸着し、液から分離後、吸着材を乾燥し、前記拮抗性物質を含む吸着材の乾燥物とし、該吸着材の乾燥物を土壌に撒布又は埋設することを特徴とした植物病害防除剤の使用法である。この発明は、この発明で用いられる拮抗微生物トリコデルマ ハルジアナムSK-5は、次の形態を有することが認められた。

*

トリコデルマ ハルジアナムSK-5の

培養濾過抗菌スペクトル

病原菌名	生育阻害率(%)
ビシューム アファニデルマータム	85
リゾクトニヤ ソラニ	91
ヘルミントスポリウム ソナタム	100
フザリウム オキシスポラム	80
マイクロネクトリエラ ニバリス	62
スクレロティニヤ ポレアリス	79
テイフラ イシカリエンシス	75

【0016】

【表2】

抗菌スペクトル(表1)測定培地組成

培地成分名	配合重量g/l
ガラクトース	10.0
ペプトン	6.0
酵母エキス	0.2
磷酸ユカリウム	0.5
硫酸マグネシウム	0.5
塩化カリウム	0.5
硫酸鉄	0.01

【0017】この発明に用いられるトリコデルマ ハル

50

*① コロニー集落

暗緑色綿毛状。

② 顕微鏡的観察

密に分生子を形成する。

【0011】分生子柄は長い。

【0012】不撚菌糸は殆んど見られない(写真①)。

【0013】分岐は複雑な樹木状(写真①、②)。

③ 電子顕微鏡観察

分生子はほぼ球形、表面滑らか、大きさ3-4 μ mフィアライドは規則的に配列し、細長く、その長さは8-10 μ m(写真③、④)。

【0014】従来用いられていた農薬は、特定の病害に対し特定の物質が作用し、病害防除を可能としてきたが、この発明で用いる菌体の培養醗酵液は、芝草の病原菌の代表とも云れているビシューム、リゾクトニヤ、フザリウム、ヘルミントスポリウム等の各属について培養醗酵条件の如何により広い抗菌スペクトルを有することが判明した。そこで代表的な病原菌に対する培養濾過液の生育阻害率を表1に示した。又この時の培地組成は表2に示す通りである。PH調節は0.2N塩酸で行った。

【0015】

【表1】

ジアナムSK-5は、この結果より植物病原菌代表供試菌株により生育阻害率に差はあるが、確実に拮抗性が認められた。

【0018】実際に植物病原菌に対する拮抗性物質産生を効率的に行うに適した培地栄養源組成及び培養醗酵条件を設定する必要がある。

【0019】例を挙げて説明すると、この発明に用いる菌は、炭素源としてグルコースの如く消費されやすい糖類より乳糖、ガラクトース、グリセリン、繊維質等が、又窒素源としては、アンモニウム塩、硝酸塩、アミノ酸等、菌に利用されやすいものより天然の窒素源(蛋白など)が適している傾向が強みられる。しかし紅色雪腐病菌とみられているマイクロネクトリエラ ニバリスは無機窒素塩を好む傾向がみられる。一般的には、栄養源として長期間を要し資化されるものが拮抗性物質産生に適した栄養源といえる。

【0020】さらに培養条件も大きく影響を受けるもので、PH、温度、通気量等は関係が深い。

【0021】例をPHにとれば、低PH4.0で培養を開始したものは、ピシューム アファニデルマータムに高い拮抗性を示し、PH5.0にて培養開始した場合にはリゾクトニヤ ソラニに高い拮抗性を示し、逆にピシューム アファニデルマータムには低くなる傾向を示した。

【0022】前記の傾向よりみて病害防除の対照となる病原菌に、より適した培養醗酵法が実際の応用に際して必要となる。

【0023】この発明に用いる菌の産生する拮抗性物質は、土壤に施用した場合、如何なる効果がみられるか試験を行った。

【0024】結果を図1に示した。

*

P. アファニデルマータム接種直後における拮抗性物質の散布効果（感染阻害）

区	発病度 ¹⁾ (meanSD)	防除価 ²⁾
散水対照	2.0 ± 0.71	0
拮抗性物質散布	0.4 ± 0.55	80

-P<0.05で散水対照区と有意差有り (μ-S)

¹⁾ 発病後1週間目の達観での罹病率(%)を0~4までの5段階で表した値。

²⁾ 防除価 = $(1 - \frac{\text{拮抗性物質散布区の発病度}}{\text{散水対照区の発病度}}) \times 100$

【0030】前記によりこの発明の菌の培養醗酵液が植物病害防除に効果があることは理解出来たが、土壤に散布するために培養醗酵液を遠方に運ぶことは不可能である。従って濃縮、拮抗性物質の分離濃縮が必要となる。この発明の菌によって産生された拮抗性物質は120℃で10分間加熱しても拮抗活性が低下することなく、又疎水的性質を有するため加熱濃縮、有機溶媒による分配も可能で、種々吸着材により選択的吸着し、有機溶媒溶出により活性を高める事も容易で、使用に際して希釈散布することが出来るものである。

【0031】近年農薬が問題視されているのは、人畜に与える薬害さらに土壤微生物相を破かいし長期的にみて安定した農業を営むことが出来ない点にある。

【0032】毒性を表す指標として白ネズミに対する急性経口毒性LD₅₀ (mg/Kg)を用いるが、この発明の菌培養液を固液分離した後、清澄濾過を行い凍結乾燥を行ったものについてその急性経口毒性はICRマウス10週令雄、雌何れの場合もLD₅₀5000mg/Kgであり著

* 【0025】試験方法はあらかじめ培養したピシューム アファニデルマータムを、目砂95に対しピートモス5の割合に配合した土壤に接種し、この発明の菌培養固液分離液を1 l/m²の割合に施用した。

【0026】前記結果は、図1の通り散布2日後には1400ケ/gあったものが110ケ/gに減じ、15日後に、2回目散布を行い、さらに2日後には40ケ/g以下となった。

【0027】この結果より、土壤中においても病原菌防除効果が認められることが明らかとなった。

【0028】次に実際に近いポット試験でベントグラスを用いて感染阻害効果を測定した結果は、表3に示す通りで80%という高い防除価を示した。

【0029】

【表3】

※ しく毒性が低い事も判明した。

【0033】

【実施例1】トリコデルマ ハルジアナムSK-5菌をスラントより10ml種培養大型試験管に殖菌し、28℃で3日間培養を行い種菌体を増殖せしめ、これをさらに300ml種培地に移し、2 lバッフル付三角フラスコにて28℃2日間培養を行う。種培養後は醗酵培地3 lに移し、5 lジャーファーメンターを用い28℃9日間通気量3.5 l/分攪拌数400rpmにて醗酵を行う。初発PHは、目的とする植物に応じて0.2規定塩酸で4.0~7.0に調節する。醗酵終了後は固液分離を行い液量が1/10となるまで減圧濃縮を行い約360mlの濃縮液を得る。防腐効果を付加するため必要に応じて木酢等を添加し経日変化を未然に防止する。

【0034】植物散布時には10倍以上に希釈し1 l/m²の割合で施用する。

【0035】上記培地組成は表4の通りである。

【0036】

【表4】

実施例1に於ける培地組成

培地成分名	種 培 地	醗 酵 培 地
可溶性澱粉	20.0 g/l	40.0 g/l
ふすま粉碎物	20.0 g/l	30.0 g/l
大豆粉末	20.0 "	10.0 "
コーンステープリカー	5.0 "	—
酵母エキス	5.0 "	—
ダイズ油	—	1.0 g/l
カゼイン	—	5.0 "
硫酸マグネシウム	0.5 g/l	0.5 "
硫酸鉄	0.5 "	0.5 "

。【0037】

【実施例2】実施例1で得た培養醗酵液3.3lを遠心分離、固液分離後固形分が15%以上となるよう減圧攪拌濃縮を行う。

【0038】この濃縮液を熱風入口温度125℃、出口温度90℃の条件のもとで噴霧乾燥し、水分8%の粉末18gを得る。使用に際しては3~6gを1lに懸濁し1l/m²の割合で散布する。

【0039】

【実施例3】ふすま800g、大豆粉200g、酵母エキス50g、コーンステープリカー50gに水1lを加え均一になるまで攪拌混合したものを120℃、15分間加熱蒸気殺菌を行う。この固体培地を実施例1の種培養液300ml加え、温度28℃10日間通気培養を行う。

【0040】培養初期は白色を呈しているが、4日目より緑色を呈するようになる。培養終了後は低温低温乾燥を、50℃以下で行い、水分13%のトリコデルマ ハルジアナムSK-5の菌糸分生子を含むふすま、大豆粉培地乾燥物1000gを得る。粗粉碎後実施例2の粉剤と1:1の割合に混合し10~20g/m²土壌にて希釈散布する。

【0041】

【実施例4】実施例1で得た培養醗酵液を固液分離後1/5量となるまで減圧攪拌濃縮を行い約500mlの濃縮液を得る。

【0042】濃縮液と同容量の酢酸エチル、ヘキサン1:1の溶媒を加え振盪5分間の後、拮抗性物質を有機溶媒層に移し、有機溶媒を蒸溜回収後残液に50%エタノール15ml加え溶解する。

【0043】散布に際しては5mlを1lに希釈して1m²に施用する。

*【0044】

【実施例5】実施例1の培養醗酵液に硅藻土の如き濾過助剤を加え清澄濾過を行う。

【0045】この透明液を合成吸着材(XAD-8オルガノ製)を充填したカラムに通液し、拮抗性物質を吸着せしめた後、50%エタノール液にて溶出させる。

【0046】この溶出液を3mlまで濃縮し使用に際しては1000倍に希釈し、1l/m²の割合にて散布する。

【0047】

【実施例6】実施例5の培養醗酵清澄液3lに、活性炭9gを加え40℃60分間攪拌後、濾過し、拮抗性物質を活性炭に吸着させ活性炭を分取し低温乾燥を行う。乾燥後の活性炭は土壌300g.にて希釈し100g/m²の割合にて散布する。

【0048】

【発明の効果】この発明によれば、植物病原菌に広く拮抗性を示す物質が産生されるのみならず、菌体が土壌中で、前記産生を継続して効果を持続させることができる効果がある。またこの拮抗性物質は、広範囲植物病原菌に殆んど例外なく有効であり、その反面毒性が低くて人畜無害である。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の拮抗性物質の効果を示すグラフ(病原菌数の減少を示す)。

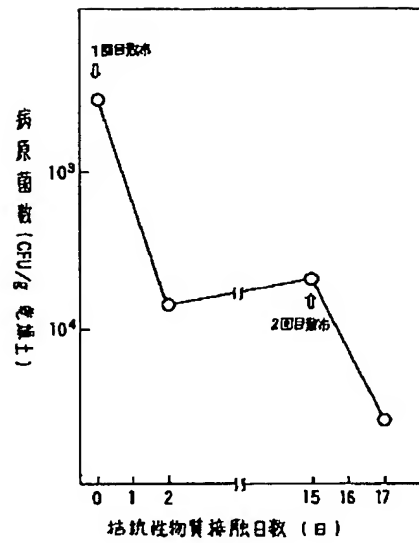
【図2】同じくトリコデルマ ハルジアナムSK-5の顕微鏡写真。150倍。

【図3】同じくトリコデルマ ハルジアナムSK-5の顕微鏡写真。500倍。

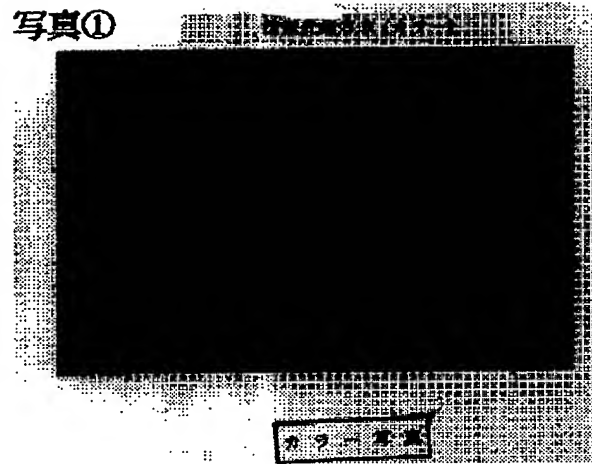
【図4】同じくトリコデルマ ハルジアナムSK-5の顕微鏡写真。500倍。

【図5】同じくトリコデルマ ハルジアナムSK-5の顕微鏡写真。1000倍。

【図1】



【図2】



【図3】

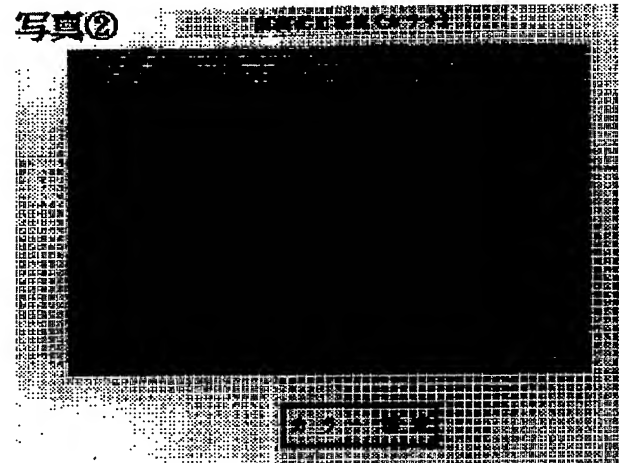
【図2】



【図3】

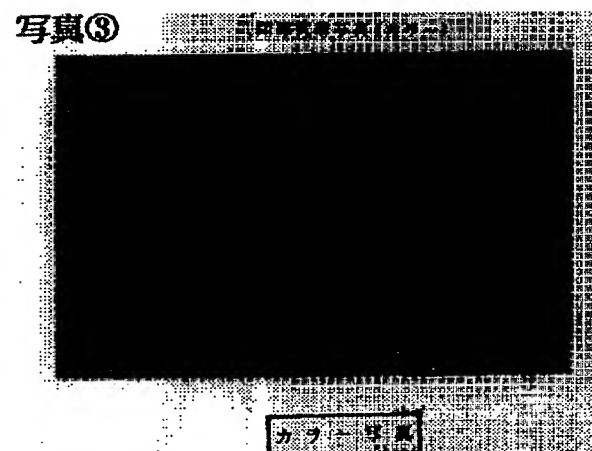


写真②



【図4】

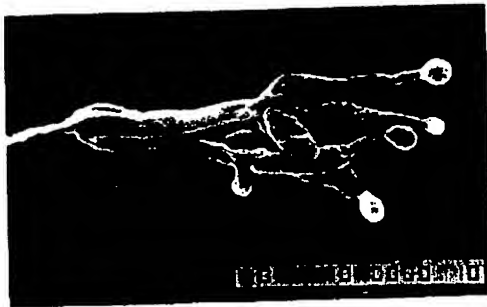
写真③



【図4】

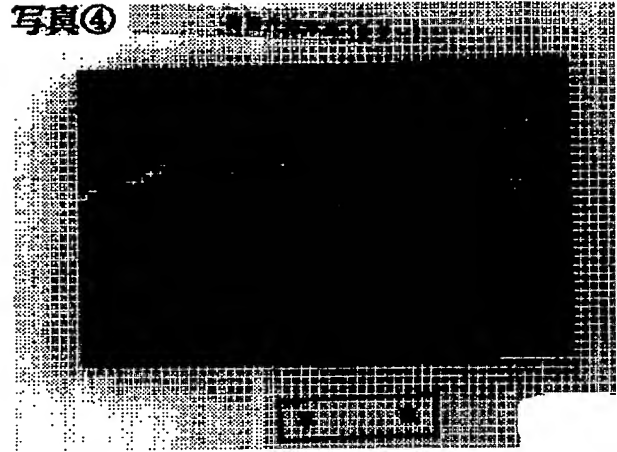


【図5】



【図5】

写真④



【手続補正書】

【提出日】平成4年2月12日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正内容】

【0015】

【表1】

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】

【表2】

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】

【表3】

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正内容】

【0036】

【表4】

【手続補正書】

【提出日】平成6年9月21日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の拮抗性物質の効果を示すグラフ（病原菌数の減少を示す）。

【図2】同じくトリコデルマ ハルジアナムSK-5を写した生物の形態の顕微鏡写真。150倍。

【図3】同じくトリコデルマ ハルジアナムSK-5を写した生物の形態の顕微鏡写真。500倍。

【図4】同じくトリコデルマ ハルジアナムSK-5を写した生物の形態の顕微鏡写真。500倍。

【図5】同じくトリコデルマ ハルジアナムSK-5を写した生物の形態の顕微鏡写真。1000倍。

【手続補正2】

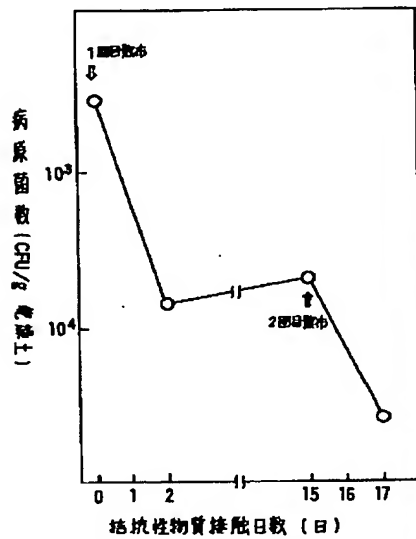
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

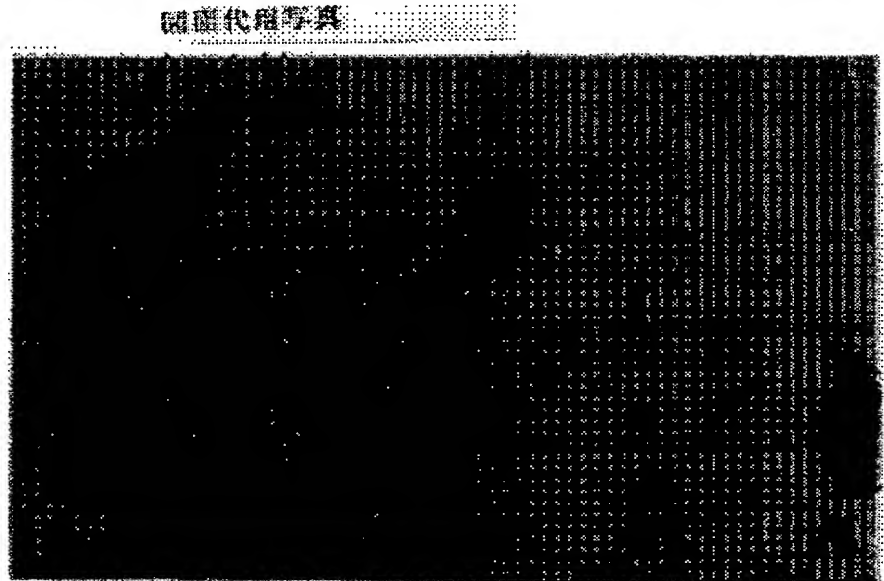
【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】

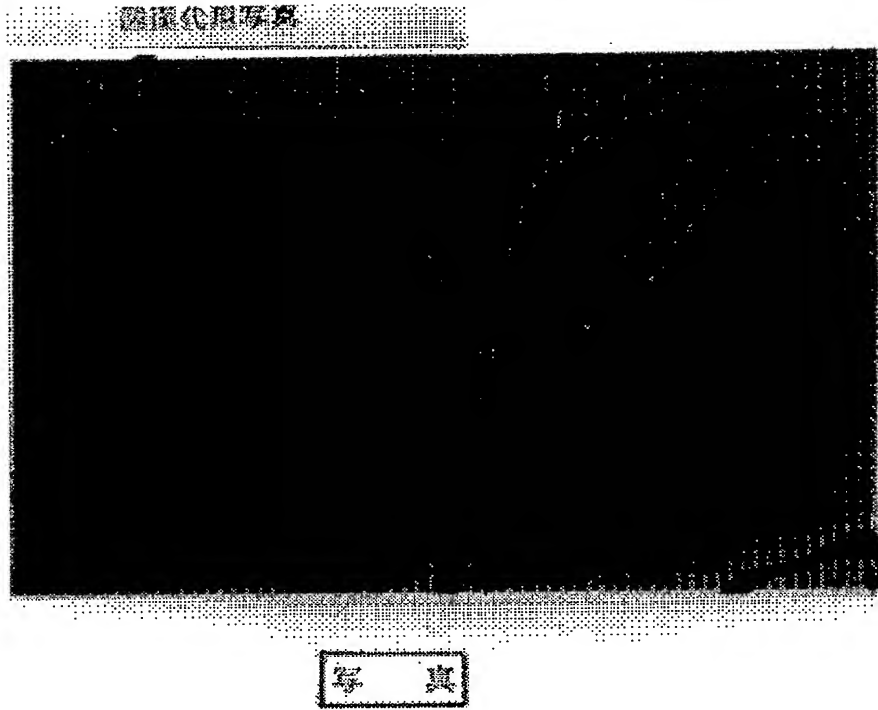


【図2】

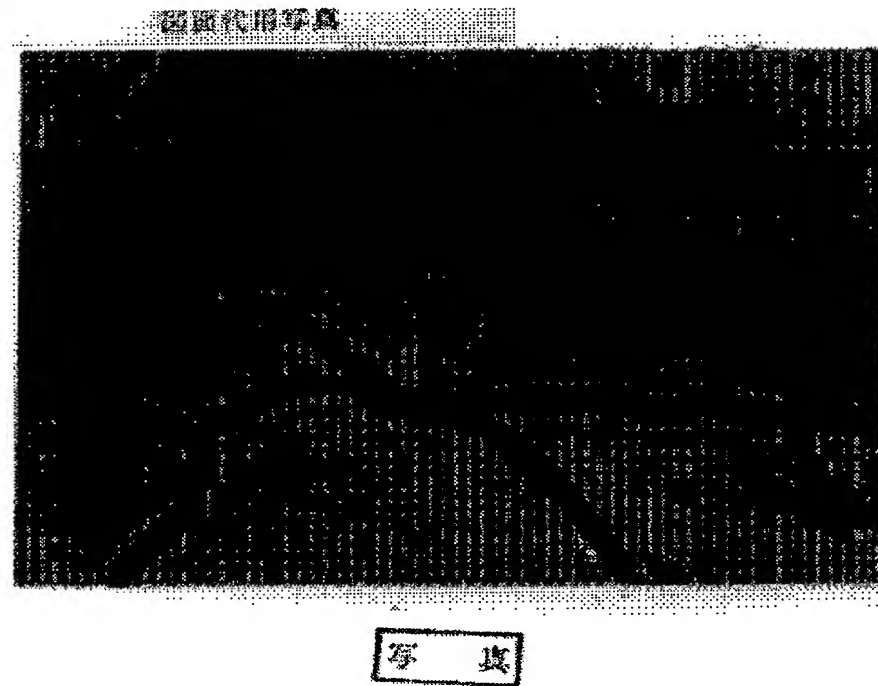


写真

【図3】



【図4】



【図5】

